

2015 04. 03

Prof. dr hab. Andrzej Piekarowicz

Warszawa, 22.03.2015

Uniwersytet Warszawski

Instytut Mikrobiologii

ul. Miecznikowa 1

02-096 Warszawa

**Ocena rozprawy doktorskiej Mgr Ewy Wons pt. „ Analiza specyficzności metylotransferazy DNA EcoVIII oraz jej homologów”**

Metylotransferazy DNA od chwili ich poznania zostały wraz z endonukleazami restrykcyjnymi szeroko wykorzystane w biologii molekularnej jako podstawowe narzędzie w klonowaniu genów i innych manipulacjach cząsteczkami DNA. Ostatnie kilkanaście lat przyniosły również istotne dane doświadczalne pokazujące, że metylacja DNA jest istotnym czynnikiem epigenetycznym zarówno u bakterii jak i u organizmów eukariotycznych. Zrozumienie mechanizmu działania tych enzymów oraz poznanie molekularnych podstaw specyficzności rozpoznawania określonych sekwencji zasad w DNA ma niezmiernie istotne znaczenie w tej dziedzinie biochemii i biologii molekularnej. Ma również znaczenie z zrozumieniu mechanizmu kontroli epigenetycznej ekspresji genów. Wraz z endonukleazami restrykcyjnymi stanowią one również doskonały model do badania oddziaływań białek z DNA. Jednym z pytań jakie stawiają sobie badacze zajmujący się metylotransferazami DNA i endonukleazami restrykcyjnymi jest pytanie czy mechanizm rozpoznawania specyficznej sekwencji zasad w DNA przez enzymy o tej samej specyficzności, a więc rozpoznających tę samą sekwencję np. 5' AAGCTTC 3' przez różne enzymy jest taki sam czy inny a jeśli inny na czym polegają różnice i z czym są związane. Stawiane przez doktorantkę cele rozprawy doktorskiej jakimi miały być (1) analiza specyficznych oddziaływań białek czterech badanych enzymów M.EcoVIII, M.HindIII, M.LlaCI oraz M.BstZIII, rozpoznających tę samą sekwencję 5' AAGCTT 3' z specyficznymi zasadami (2) badanie oddziaływań z szkieletm cukrowo-fosforanowym (3) wpływu otoczenia nukleotydowego specyficznej sekwencji na wydajność metylacji i (4) określenie domeny białkowej odpowiedzialnej białka M.EcoVIII za rozpoznawanie sekwencji specyficznej mieszczą się w aktualnym nurcie badań nad metylotransferazami DNA.

Przedstawiona do oceny praca doktorska ma układ typowy dla takich opracowań. Praca rozpoczyna się „Wstępem”, przedstawiającym najpierw ogólne wiadomości na temat metylotransferaz DNA a następnie omówiona została budowa metylotransferaz DNA, katalityczny mechanizm ich działania, funkcje określonych domen białkowych oraz pokrewieństwo ewolucyjne. W związku z zakresem prowadzonych badań omawianych w pracy doktorskiej autorka omówiła również mechanizm oddziaływań białko-DNA oraz strukturę hybrydów DNA/RNA. W końcowej części „Wstępu” autorka omówiła biologiczne znaczenie metylacji DNA.

Po przeczytaniu, mogę stwierdzić, że „Wstęp” dobrze przygotowuje czytelnika do zrozumienia pozostałych części rozprawy doktorskiej. Jednocześnie chciałbym podkreślić, że ta część rozprawy doktorskiej świadczy dobitnie o bardzo dobrej znajomości przez doktorantkę współczesnej literatury dotyczącej poruszanych zagadnień i umiejętności ich zrozumiałego i logicznego przedstawiania, chociaż nie ustrzegła się drobnych niedoskonałości takich jak brak informacji o roli hydroxymetylcytozyny u organizmów eukariotycznych czy stwierdzeniu (str.28), że „niektóre metyltransferazy kodowane przez bakteiofagi i bakterie pełnią rolę w przeciwdziałaniu degradacji DNA przez endonukleazy restrykcyjne ..” Większość metylotransferaz kodowanych przez bakterie chroni DNA przed taką degradacją.

Rozdział „Materiały” zawiera wystarczająco szczegółowe dane dotyczące pochodzenia poszczególnych szczepów bakterii, plazmidów i fagów, starterów do reakcji PCR, buforów itp.

W rozdziale „Metody” Autorka opisała stosowane przez siebie techniki badawcze. Składają się na nie metody z zakresu mikrobiologii, genetyki, inżynierii genetycznej oraz biochemii. Opis metod jest na ogół na tyle szczegółowy, że umożliwia powtórzenie eksperymentów. Drobne uwagi (1) str. 42 „do oczyszczania metylotransferaz DNA .. wykorzystano system oparty o polimerazę RNA faga T7... chodzi raczej do ekspresji genów, (2) nie ma danych na temat wektora pT7-6, (3) str. 46, opis określenia aktywności metylującej – jakie stężenia [<sup>3</sup>H AdoMet były stosowane? ( jest to podawane dopiero przy poszczególnych doświadczeniach) W sumie zarówno „Materiały” jak i „Metody” zawierają wszystkie informacje potrzebne do stwierdzenia, że zastosowane metody odpowiadają współczesnym standardom stosowanym w badaniach endonukleaz restrykcyjnych i są odpowiednie dla rozwiązania postawionych sobie celów badawczych.

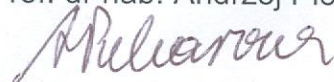


Doktorantka rozpoczęła swoje badania nad mechanizmem rozpoznawania specyficznej sekwencji przez wybrane metylotransferazy DNA od określenia w jakich warunkach enzymy te są zdolne do rozpoznawania niespecyficznej sekwencji określanej jako „starowe” tzn. takich, w których w kanonicznej sekwencji zmieniona jest conajmniej jedna pojedyncza para zasad. Należy założyć, że badane metylazy należą do grupy metylaz nie wykazujących w warunkach standardowych takiej „rozluźnionej” aktywności. Doktorantka wykazała, że w obecności DMSO lub glicerolu niektóre z nich wykazują taką aktywność. Trudno dokładnie określić w tej części pracy, jaki jest poziom takiej metylacji gdyż brak w tych doświadczeniach kontroli w postaci określenia poziomu w tych samych warunkach metylacji kanonicznej. Doktorantka wykazała też, że aktywność „starowa” nie może być niwelowana przez jony obecne w komórce, ale dane te oparte są o pomiary stopnia metylacji oligonukleotydów a nie plazmidowego DNA jak w eksperymentach określających wpływ DMSO na aktywność „starową”. Dokładnie przeprowadzone badania dotyczące kinetyki reakcji metylacji wykazały, że M.EcoVIII nawet w warunkach standardowych jest zdolny do metylacji sekwencji niekanonicznych. Dokładna analiza interakcji metylaz z poszczególnymi zasadami w rozpoznawanej sekwencji wykazała, że najistotniejsze są oddziaływania z zasadami występującymi w środku specyficznej sekwencji. Z badań doktorantki wynika, że równie ważne jak oddziaływania pomiędzy aminokwasami a zasadami sekwencji rozpoznawanej przez enzym są oddziaływania ze szkieletem fosforanowo-cukrowym. Druga część rozprawy doktorskiej poświęcona jest analizie białek metylaz pod względem określenia jakie aminokwasy poszczególnych metylotransferaz DNA są odpowiedzialne za te oddziaływania. Doktorantka przeprowadziła bardzo precyzyjnie wykonane doświadczenia, w których (1) przeprowadziła chemiczną modyfikację reszt histydynowych i lizynowych stanowiących konserwowane aminokwasy w domenie TRD i (2) dokonała zamiany konserwowanych reszt aminokwasowych w obrębie domeny TRD na neutralne reszty aminokwasowe w enzymie M.EcoIII. Wyniki pomiarów aktywności metylacyjnej otrzymanych mutantów pozwoliły na określenie, że inaktywacja tych aminokwasów prowadzi u wszystkich badanych enzymów do utraty aktywności metylacyjnej. Mutagenizacja reszt aminokwasowych pozwoliła na określenie, które z nich odgrywają decydującą rolę w aktywności enzymów. Doświadczenia te przynoszą wiele cennych wyników w znacznym stopniu rozszerzającym naszą wiedzę na temat mechanizmu działania metylotransferaz DNA

oraz wskaują, że ogólny mechanizm rozpoznawania zasad w sekwencji kanonicznej jest dla wszystkich tych metylaz bardzo podobny chociaż ich sposób działania może się trochę różnić. Na uwagę zasługuje niezwykle rzetelna Dyskusja, która jest bardzo mocną stroną tej wartościowej pracy doktorskiej. W rozdziale tym uzyskane wyniki skonfrontowano w bardzo kompetentny i szeroki sposób z danymi literaturowymi. Na zakończenie chciałbym podkreślić, że pracę doktorską Pani Ewy Wons oceniam bardzo wysoko. O tej ocenie decydują względy merytoryczne. Bez wątpienia jest to praca bardzo wartościowa.

W konkluzji pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Ewy Wons do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje jednocześnie o nageodzenie tej pracy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Andrzej Piekarowicz



Warszawa, 15. 3.2015